

DERWENT PUBLICATIONS LTD

17
3/16
1979
1981

① BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

② Offenlegungsschrift
DE 29 44 138 A 1

③ G 01 N 35/00

④ Abgrenzung
⑤ Anmeldungs-
⑥ Offenlegungsgesetz

P 29 44 138 1 52
2 11 79
11 6 81

DE 29 44 138 A 1

⑦ Anmelder

Technicon GmbH, 6380 Bad Vilbel, DE

⑧ Erfinder

Assmann, Prof. Dr. med., Carl, Med., Dr. rer. nat.,
Hans Dietrich, AGB Münster, DE, Spacht, Dipl. Chem.,
Dr. rer. nat., Werner, 3610 Uster, DE, Weber, Dipl. Phys.,
Romer, 6380 Niederbretten, DE

Prüfungstermin gem. 1. Abs. PatG ist gesetzt

⑨ Verfahren und Vorrichtung zur Durchführung von Analysen in automatisierten Analysensystemen unter Abtrennung von Nichtschmelzen

5
7
3
1
2

1

1

1011

DE 29 44 138 A 1

DEUTSCHES PATENTAMT 63100 D 11 15 81

Patent
Reichel
61111
1981

TECHNICON

1. Verfa.
Analysens
Durchfluss
d a d u r
daß man d
tenen ode
Inkubatio
führten A
Probenstr
durch Abs
einen all

2. Verfa.
Lipoproate
über die
d a d u r
daß man a
aus Phosph
Density-Li
ausfällt,
tion den a
bleibenden
und der er

REST AVAILABLE COPY

Pat. Cl. 2
G 01 N 35/08

Patentsanwälte
Reichel u. Reichel
8 Frankfurt a. M. 1
Postfach 13

2362

2944138

TECHNICON GMBH, 6368 Bad Vilbel 1

Patentansprüche

1. Verfahren zur Durchführung von Analysen in automatischen Analysensystemen, die nach dem Prinzip des kontinuierlichen Durchflusses arbeiten, unter Abtrennung von Niederschlägen, das durch gekennzeichnet ist, daß man den in einer zu analysierenden Flüssigkeit enthaltenen oder in ihr erzeugten Niederschlag - ggf. nach einer Inkubationszeit - in einem horizontal und geradlinig geführten Abschnitt eines gleichmäßig mit Luft segmentierten Probenstromes absitzen läßt, den sedimentierten Niederschlag durch Absaugen entfernt und aus dem verbleibenden Probenstrom einen aliquoten Teil zur Analyse entnimmt.

2. Verfahren nach Anspruch 1 zur Bestimmung von High-Density-Lipoproteinen (HDL), insbesondere in Körperflüssigkeiten, über die Messung des Cholesteringehalts, das durch gekennzeichnet ist, daß man aus der verdünnten Probe durch Zusatz eines Reagens aus Phosphorwolframsäure und Magnesiumchlorid die Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL) und Low-Density-Lipoproteine (LDL) ausfällt, die Probe anschließend inkubiert, nach Sedimentation den abgesetzten Niederschlag absaugt und aus dem verbleibenden Flüssigkeitsstrom einen aliquoten Teil entnimmt und der enzymatischen Cholesterinanalyse zuführt.

130024/0034

Dr. Dr. med.
Reichel, Dipl.-Chem.
I. Weber, Dipl.-Phys.

ohne weitere Abgrenzung

• • • • •

3.
Ar
de
f2
ne
al
zu
tt
or
le
ai
d
da
le
le
zu
ge
di
ac
ke
4.
fa
d
da
ner
le:
ap:
Ei:
ap:
de:
is

1138

- 2 -

2944138

3. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 mit durch eine Förderpumpe perrbaren und für den Durchfluß freigebbaren Zuführungsleitungen für Waschflüssigkeit, Luft, Probe und Reagenzien, einem Probennehmer, der von einem Probensteller Anteile der zu untersuchenden Flüssigkeit und Waschflüssigkeit in die Zuführungsleitung eingibt, einer Einmündung der Luftleitung in die Probenleitung, einer stromabwärts davon angeordneten Einmündung einer Reagenzienleitung in die Probenleitung, einer davon stromabwärts angeordneten Mischspirale mit Heizbad sowie einem Fotometer und einem Registriergerät, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Einmündungen von Luft- und Reagenzienleitung, ggf. nach der Einmündung einer Füllungsreagenzienleitung und bzw. oder Einschaltung einer Mischspirale (5) zur Inkubation der Ausfällung, eine aus horizontal und geradlinig verlaufenden Leitungsabschnitten bestehende Sedimentationschlange (6) mit einem Auslaß für den Niederschlag (B) und einem Auslaß für die überstehende Flüssigkeit (A) vorgesehen ist.

4. Vorrichtung gemäß Anspruch 3 zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der Einmündung der Luftleitung und der Sedimentationschlange (6) die Einmündung einer Füllungsreagenzienleitung und stromabwärts davon daran anschließend eine Mischspirale (5) vorgesehen sind und daß der Abschnitt von der Einmündung der Füllungsreagenzienleitung bis zum Ende der Mischspirale (5) aus einem antitropischen Werkstoff, insbesondere Polytetrafluorethylen, besteht oder mit ihm ausgekleidet ist.

130024/0036

4138

- 3 -

2944138

TECHNICON CORP., 6368 Red Vilbel-1

Verfahren und Vorrichtung zur Durchführung
von Analysen in automatischen Analysensystemen
unter Abtrennung von Niederschlägen

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Durchführung von Analysen in einem kontinuierlichen Fließsystem unter Abtrennung von Präzipitaten, die entweder mit der Probe zugeführt werden oder im Verlauf einer Reaktion entstehen. Die Analyse wird dann mit einem Teil des klaren Überstandes durchgeführt.

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Bestimmung von High-Density-Lipoproteinen (HDL) über die Messung des Cholesteringehaltes, bei dem zuvor die Low- und Very-Low-Density-Lipoproteine (LDL bzw. VLDL) ausgefällt werden müssen.

Die Hypercholesterämie ist als primärer Risikofaktor für das Auftreten der koronaren Herzkrankheiten seit 25 Jahren bekannt. Jüngste Befunde scheinen allerdings an der Allgemeinverbindlichkeit des Gesamt-Serumcholesterinspiegels als eines Risikofaktors gewisse Modifikationen erforderlich zu machen. In vielfältigen Studien konnte die Bedeutung des HDL-Cholesterins nachgewiesen werden. Aufgrund einer Vielzahl von Befunden stellte sich das HDL-Cholesterin - im Gegensatz zum Gesamt-Cholesterin - als ein Schutzfaktor gegen die koronare Herzkrankheit dar; niedrige HDL-Cholesterinspiegel sind als Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit anzusehen.

130024/0034

für
nach-
sch-
ster-
oben-
lei-
ange-
troben-
spirale
ergerät,

en-
enz-
e (5)
nd
de Se-
oder-
asig-

is Ver-

Sedi-
reagens-
ne Misch-
m der
ler Misch-
ubeson-
gekleidet

eine
bes-
rer
lich
schu-
im

fir-
ell
kan
set
gen
sti
vor
ein
ein
tio
des

ge
ver
una
Pip

1
ch-

gen

138

- 4 -

2944138

HDL-Cholesterin läßt sich einfach und spezifisch durch eine enzymatische Reaktion mit nachfolgender Farbentwicklung bestimmen, wenn zuvor die anderen Lipoproteine mit geringerer Dichte abgetrennt werden. Aus einer Reihe von Veröffentlichungen geht hervor, daß ein Reagenz aus Phosphorwolframsäure und Magnesiumchlorid spezifisch VLDL- und LDL-Anteile im Serum ausfällt, während HDL in Lösung verbleibt.

Aus der Methodenbeschreibung "HDL-Cholesterin" der Firma Boehringer Mannheim aus dem Jahre 1979 ist ein manuelles Verfahren unter Einsatz des genannten Reagenzes bekannt, das sich aus den folgenden Arbeitsschritten zusammensetzt: Abmessen der Probe, Zusatz einer abgemessenen Reagenzmenge, Mischen des Ansatzes, Inkubation für eine bestimmte Zeit, Zentrifugation für eine bestimmte Zeit mit vorgegebener Leistung, Abnahme des Überstandes, Einsatz eines aliquoten Teils zur Cholesterinbestimmung, Zugabe einer abgemessenen Menge von Cholesterin-Reagenz, Inkubation für eine bestimmte Zeit und fotometrische Bestimmung des entstandenen Farbstoffes.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine derartige aufwendige manuelle Arbeitsweise durch ein automatisches Analyseverfahren zu ersetzen, das sich dadurch auszeichnet, daß unabgemessene Proben eingesetzt werden können und keine Pipettier- und Zentrifugierschritte erforderlich sind.

Gegenstand der Erfindung sind das in den Ansprüchen 1 und 2 gekennzeichnete Verfahren sowie die in den Ansprüchen 3 und 4 gekennzeichnete Vorrichtung.

Die Erfindung wird im folgenden an Hand von Zeichnungen näher erläutert, worin

130024/0034

d eine
ontit-
Verlauf
einem

en und
opre-
s, bei
(LDL

tofaktor
: 25
an der
spiegels
rdlich
ung des
r Viel-
- im
ktor
chole-
e Herzi-

verla:
Prober

erfin:
einri

fahre

bedeu

sind
dungs

sigkel
benach
und in
Dichte
der un
Sedime
abgesa
Nieder
tionas
Teil a
segmen
und in
ausgew

344138

- 5 -

2944138

isch durch
entwicklung
t geringe-
Veröffent-
orwofras-
DL-Anteile
t.

n° der
ein mam-
nnes be-
zusammen-
ben Res-
line be-
zeit mit
Einsatz
Zugabe
Inkuba-
stimung

e aufwendi-
Analysen-
net, daß
d keine
sind.

sprüchen
en Ansprü-

Zeichnun-

Fig. 1 eine schematische Darstellung des Strömungs-
verlaufs in einem durch zwei Luftblasen-segmentierten
Probenabschnitt.

Fig. 2 eine schematisierte Ansicht einer bei der
erfindungsgemäßen Vorrichtung verwendeten Sedimentations-
einrichtung und

Fig. 3 ein Fließschema des erfindungsgemäßen Ver-
fahrens

bedeuten.

Für eine ausreichende Sedimentation in vertretbarer Zeit
sind zwei Voraussetzungen notwendig, wie sie in dem erfin-
dungsgemäßen Verfahren verwirklicht sind:

1. Gleichmäßige Luftsegmentierung des Stromes,
2. horizontaler und geradliniger Fluß bei Vermeidung
jeglicher Störung des Strömungsverhaltens, wie er
gemäß Abb. 1 zu einer völlig symmetrischen Strö-
mungsverteilung führt.

Durch die zweiseitige Begrenzung des strömenden Flüssigkeitssegments mit zwei Luftblasen werden die der Wand benachbarten Flüssigkeitsschichten in die Mitte des Segments und in Fließrichtung transportiert. Teilchen mit größerer Dichte als der der Flüssigkeit reichern sich sehr schnell in der unteren Hälfte des Flüssigkeitssegments an. Wird nach der Sedimentationsstrecke etwa die Hälfte des Stroms nach unten abgesaugt, verbleibt ein fast klarer Überstand. Verbleibende Niederschlagareste setzen sich auf einer zweiten Sedimentationsstrecke ab. Zur Analyse wird von oben ein aliquoter Teil abgenommen und in bekannter Weise etwa mit einem luftsegmentierten Strom aus Analysenreagens in Kontakt gebracht und inkubiert, wonach die erhaltene Farbreaktion fotometrisch ausgewertet wird. 130024/0034

D
Anspruch
angewand
Probenau
saugten
und inku
Abzugen
ändert s
rig-fett
wenn die
Schluß b
Die Best
Niederac
entsprec

O
d
RCC
CH

HC

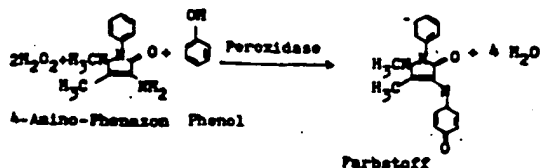
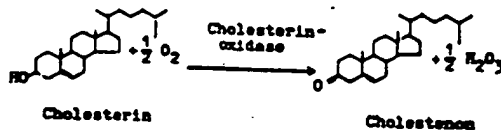
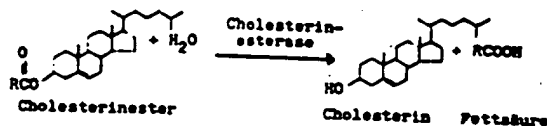
$2H_2O_2 \cdot H_2$
 H_2C
4-Amino-

138

- 6 -

2944138

Das allgemeine Verfahren nach Anspruch 1 wird gemäß Anspruch 2 zur automatischen Bestimmung von HDL-Cholesterin angewandt. Das Verfahren verläuft vollautomatisch von der Probenaufnahme bis zur fotometrischen Auswertung. Die angesaugten Proben werden verdünnt, mit Fällungsreagens versetzt und inkubiert, bevor der Niederschlag nach Sedimentation durch Absaugen entfernt wird. Der Niederschlag der Lipoproteine verändert sich im Verlauf der Inkubation: Anfangs ist er schmierig-fettig und bleibt daher leicht an der Gefäßwandung haften, wenn diese nicht aus antistatischen Material besteht. Zum Schluß besitzt er jedoch eine fest körnige, feste Konsistenz. Die Bestimmung der Cholesterinkonzentration erfolgt in der vom Niederschlag befreiten Lösung nach einer enzymatischen Reaktion entsprechend den folgenden Gleichungen:



130024/0034

gemäß
einem
best.
terv
hält
Kurve
Zink
fitt:
adhl:
(PTT
gekl
zu v

Beis:

stoff:
befl:
Derv:
einem
fluss:
vern:
den..

neb:
Über:
eind:
luft:
(1,0
ethy:
Luft:
setz

rer Zeit
rfin-

ldung
ie er
trö-

Flu-
and
egments
erer
nell in
nach der
unten
eibende
centa-
ter
luft-
brucht
netrisch

Die Analysenvorrichtung zur Durchführung der Verfahren gemäß der Erfindung besteht gemäß Fig. 3 beispielsweise aus einem Probennehmer 1, einer Pumpe 2, einer analytischen Einheit, die eine Mischspirale 5, ein Heizbad 7 mit einer weiteren Mischspirale und eine Sedimentationschlangel 6 enthält, sowie einem Einkanal-Durchflußfotometer 3 mit einer Küvette von 15 mm Länge und 1,5 mm Durchmesser sowie einem Einkanal-Linienschreiber 4. Vorzugsweise sind das Zugabefitting 8 und die Inkubationschlangel 5 aus einem antiadhäsiven Werkstoff, insbesondere Polytetrafluorethylen (PTFE), gefertigt oder mit einem derartigen Werkstoff ausgekleidet, um ein Anhaften der Ausfällungen an der Wand zu vermeiden.

Beispiel

Die Bereitstellung der Proben (Serum) erfolgt in Kunststoffbechern, die sich im Probenteller des Probennehmers 1 befinden. Die Proben werden eine nach der anderen unter Durchschaltung von Waschflüssigkeitsabschnitten in einem derartigen Rhythmus angesaugt, daß das Proben/Waschflüssigkeits-Entnahmeverhältnis 6:1 beträgt und 60 Proben/h verarbeitet werden. (Diese Betriebsweise kann variiert werden.)

Das die Waschflüssigkeit enthaltende Gefäß im Probennehmer wird über die Pumpe 2 mit 2 ml Wasser/min versorgt. Über dem in der Pumpe 2 installierten Probenschlauch mit einer Förderleistung von 0,16 ml/min wird das Serum in einem luftsegmentierten Strom von Füllungsreagenz mit Netzmittel (1,0 ml/min) über eine Zugabestelle 8 aus Polytetrafluorethylen (PTFE) zudosiert. Der Luftschlauch fördert 0,42 ml Luft/min. Das Füllungsreagenz ist wie folgt zusammengesetzt:

0,5 %
6,25 mM
20 mM
pH 7,1
5 ml P.

Nach 25 Windungen
schlangel 6 :
schlag 8 wird
Überstand =
Flüssigkeit
Luft segmen-
ter in eine
optische Di-
Probe ent-
nommen. 2

Wa/Gu

8

- 8 -

2944138

0,5 % Phosphorwolframsäure
6,25 mM Magnesiumchlorid
20 mM Natriumhydroxid
pH 7,1
3 ml Polyoxymethylenlaurylather (Brij 35) pro 1000 ml

Nach der Inkubation in der PTFE-Mischspirale 5 mit 25 Windungen fließt der Strom durch die Sedimentations-
schlange 6 mit 1 Windung (Fig. 2). Der angereicherte Nieder-
schlag B wird mit 0,8 ml/min nach unten abgesaugt. Aus dem
Überstand wird am Ende mit 0,16 ml/min ein Teil A der
Flüssigkeit und der Luftblasen abgenommen und einem mit
Luft segmentierten Strom aus Cholesterinreagens zugesetzt,
der in einer Heizschlange bei 37 °C inkubiert wird. Die
optische Dichte des in der enzymatischen Reaktion mit der
Probe entstehenden Farbstoffes wird in Durchflußfotometer 3
gemessen. Das Ergebnis erscheint auf dem Schreiber 4.

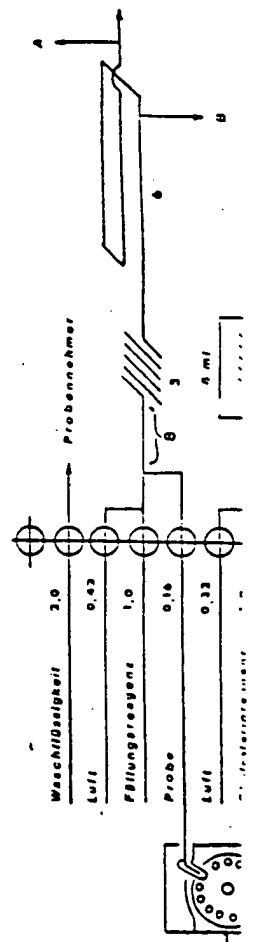
Va/Oa

130024/0034

DERWENT PUBLICATIONS LTD.

DERWENT PUBLI

9.
Leerseite



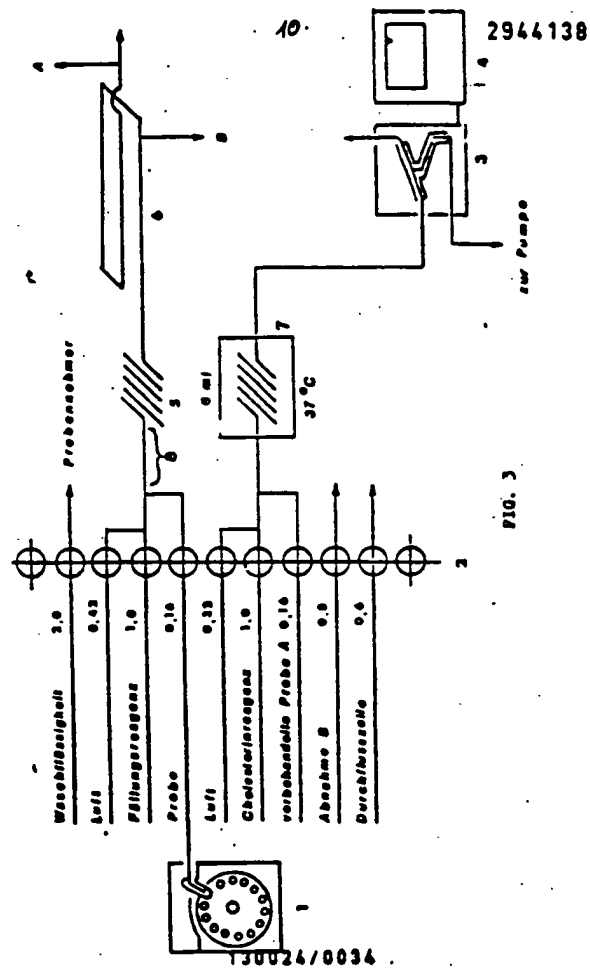
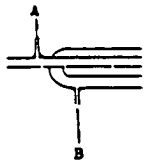
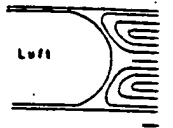


Fig. 3



DERWENT PUBLICATIONS LTD

DE

4138

49.
2944138

Rechner: 29 49 138
M. CL.: 0000 2040
Anmeldungs- 2. November 1970
Offenlegungsgang: 11. Juni 1980

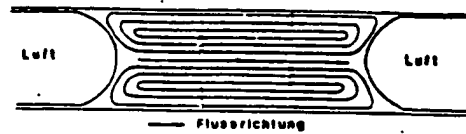


FIG. 1

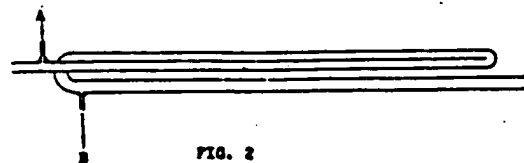


FIG. 2

130024/0034

• GUNDESH
DEUTSCH



DEUTSCH
PATENT

• Anmelden:
AGS Anmelden
Gesellschaft für
DE

• Verfahren zur

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.